

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 30 March 2000 (30.03.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/04479	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 99044M
<b>International filing date (day/month/year)</b> 20 August 1999 (20.08.99)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 20 August 1998 (20.08.98)
<b>Applicant</b> TSUGANEZAWA, Keiko	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 February 2000 (18.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b>  Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
KRF Building, 5th floor  
5-5, Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 104-0031  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 12 October 1999 (12.10.99)	
Applicant's or agent's file reference 99044M	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP99/04479	International filing date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 20 August 1998 (20.08.98)
Applicant SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
20 Augu 1998 (20.08.98)	10/233892	JP	08 Octo 1999 (08.10.99)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Carlos Naranjo

Telephone No. (41-22) 338.83.38

# PATENT COOPERATION TREATY

WO 00/11146  
PCT/JP99/04479

PCT

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
KRF Building, 5th floor  
5-5, Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 104-0031  
JAPON

RECEIVED  
MARCH 02 2000  
SIKs & Co.

Date of mailing (day/month/year) 02 March 2000 (02.03.00)		
Applicant's or agent's file reference 99044M		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP99/04479	International filing date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)	
Priority date (day/month/year) 20 August 1998 (20.08.98)		
Applicant SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,EP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
CA,NZ

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 02 March 2000 (02.03.00) under No. WO 00/11146

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
KRF Building, 5th floor  
5-5, Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 104-0031  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 30 March 2000 (30.03.00)		
Applicant's or agent's file reference 99044M		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP99/04479	International filing date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)	
Priority date (day/month/year) 20 August 1998 (20.08.98)		
Applicant SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, CA, NZ, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed **until 31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  Kiwa Mpay <i>KMP</i>  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi  
KRF Building, 5th floor  
5-5, Kyobashi 1-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 104-0031  
JAPON

99.9.27.51

SIKs &amp; Co.

Date of mailing (day/month/year) 13 September 1999 (13.09.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 99044M	International application No. PCT/JP99/04479

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD. (for all designated States except US)  
TSUGANEZAWA, Keiko (for US)

International filing date : 20 August 1999 (20.08.99)  
Priority date(s) claimed : 20 August 1998 (20.08.98)  
Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 03 September 1999 (03.09.99)  
List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, CA, NZ, US

## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase  
☒ confirmation of precautionary designations  
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  Y. KUWABARA
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



1/4

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本 (出願用) - 印刷日時 1999年08月20日 (20.08.1999) 金曜日 10時08分21秒

99044M

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	この特許協力条約に基づく国際出願願書(様式 - PCT/RO/101)は、右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.83 (updated 01.03.1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	99044M
I	発明の名称	偶蹄目エビモルフィン
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	住友電気工業株式会社 SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD. 541-0041 日本国 大阪府 大阪市中央区 北浜4丁目5番33号 5-33, Kitahama 4-chome Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0041 Japan
II-4ja	名称	
II-4en	Name	
II-5ja	あて名:	
II-5en	Address:	
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	津金沢 恵子 TSUGANEZAWA, Keiko 244-8588 日本国 神奈川県 横浜市栄区 田谷町1番地 住友電気工業株式会社横浜製作所内 c/o YOKOHAMA WORKS OF SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD., 1, Taya-cho Sakae-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 244-8588 Japan
III-1-4ja	氏名(姓名)	
III-1-4en	Name (LAST, First)	
III-1-5ja	あて名:	
III-1-5en	Address:	
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 1999年08月20日 (20.08.1999) 金曜日 10時08分21秒




99044M

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	今村 正純
IV-1-1en	Name (LAST, First)	IMAMURA, Masazumi
IV-1-2ja	あて名:	104-0031 日本国 東京都 中央区 京橋1丁目5番5号 KRFビル5階
IV-1-2en	Address:	5th Floor, KRF Bldg., 5-5, Kyobashi 1-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3271-1331
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3271-1410
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	塩澤 寿夫; 釜田 淳爾
IV-2-1en	Name(s)	SHIOZAWA, Hisao; KAMATA, Junji
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AU CA NZ US
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	先の出願日	1998年08月20日 (20.08.1998)
VI-1-2	先の出願番号	特願平10-233892
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 1999年08月20日（20.08.1999）金曜日 10時08分21秒

99044M

VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書（配列表を除く）	17	-
VIII-3	請求の範囲	2	-
VIII-4	要約	1	99044m.txt
VIII-5	図面	0	-
VIII-6	明細書の配列表	8	-
VIII-7	合計	32	
VIII-8	添付書類 手数料計算用紙	添付 ✓	添付された電子データ -
VIII-9	別個の記名押印された委任状		-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込みを証明する書面	-
VIII-17	その他	優先権書類送付請求書	-
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	今村 正純	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名(姓名)	塩澤 寿夫	
IX-3	提出者の記名押印		
IX-3-1	氏名(姓名)	釜田 淳爾	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

99044M

原本（出願用） - 印刷日時 1999年08月20日（20.08.1999）金曜日 10時08分21秒

10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	
------	----------------------------------	--

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

特許協力条約に基づく国際出願願書(願書付属書-  
手数料計算用紙)

99044M

原本(出願用) - 印刷日時 1999年08月20日 (20.08.1999) 金曜日 10時08分21秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	受理官庁の日付印	
0-4	(付属書) この特許協力条約に基づく国際 出願願書付属書(様式 - PCT/RO/101(Annex))は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.83 (updated 01.03.1999)
0-9	出願人又は代理人の書類記号	99044M
2	出願人	住友電気工業株式会社
12	所定の手数料の計算	金額/係数 小計(JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒ 18,000
12-2	調査手数料 S	⇒ 77,000
12-3	国際手数料 基本手数料 (最初の30枚まで) b1	54,800
12-4	30枚を越える用紙の枚数	2
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,300
12-6	合計の手数料 b2	2,600
12-7	b1 + b2 = B	57,400
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数	5
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は10)	5
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	12,600
12-11	合計の指定手数料 D	63,000
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R	-16,900
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒ 103,500
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数	1
12-15	1優先権証明書当たり (X) の手数料	1,500
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒ 1,500
12-17	納付すべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒ 200,000
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 氏名(名称)	9 6 2 1 弁理士 今村正純
13-1-2	出願人による言及 氏名(名称)	9 2 6 3 弁理士 塩澤寿夫

13-1-3	出願人による言及 氏名(名称)	9 5 8 4 弁理士 釜田淳爾
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。確認してください。
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 国際出願に図面が含まれていませんが、よろしいですか？
		Yellow 添付書類”別個の記名押印された委任状”が含まれていません。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Yellow! 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。

## 明 細 書

### 偶蹄目エピモルフィン

#### 技術分野

本発明は、ブタ、ウシ、ヒツジなどの偶蹄目由来のエピモルフィンに関する。

#### 背景技術

動物の諸器官は上皮組織がその形態を構築し、その周りに間充織細胞が存在しているが、エピモルフィンは、間充織細胞の特に上皮細胞の近傍に多く発現している細胞膜蛋白である (Hirai, Y., et al., Cell, 69, pp.471-481, 1992)。上皮組織の形態形成の進行には、間充織細胞からのシグナルが必要であると言われている (Gumbiner, B.M., Cell., 69, pp.385-387, 1992)。エピモルフィンは、マウスの他にヒト、トリ及びラットでクローニングされており、疎水性部位の配列が異なるアイソフォームが存在することが知られている (Zha, H., et al., Genomics, 37, pp.386-389, 1996; Hirai, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 191, pp.1332-1337, 1993; Oka, Y., 発生生物学会, 1997年5月)。

エピモルフィンは、マウスにおいては胎児上顎皮膚での毛の分化、胎児肺の管腔構造への分化という上皮組織の形態形成作用に深く関わっていることが知られている (Hirai, Y., et al., Cell, 69, pp.471-481, 1992; Koshida, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 234, pp.522-525, 1997)。また、間充織細胞を活性化し、IL-6、IL-8のサイトカイン分泌を促進している (Oka, Y., et al., Exp. Cell Res., 222, pp.189-198, 1996)。最近では、ミルクプロテインを生産するSCp2細胞にエピモルフィンを加えると該細胞が増殖して分岐した管腔構造を形成することが明らかになっている (Hirai, Y., et al., J. Cell Biol., 140, pp.159-169, 1998)。エピモルフィンは、臓器の異常に起因する疾患の発症機序の解明、診断法、治療法の開発、毛や管腔・骨・歯の形成、血管の新生ある

いは新たな創傷治療法の開発に有効であることが期待されている(Zha, H., et al., Genomics, 37, pp.386-389, 1996; Panaretto, B.A., Reprod. Fertil. Dev., 5, pp.345-360, 1993; Matsuki, Y., et al, Archs. Oral Biol., 40, pp.161-164, 1995)。

#### 発明の開示

動物の乳中に所望の蛋白質を分泌させる、いわゆる動物工場が最近実用化されている。乳中に所望の蛋白質を分泌させるための動物としては、ウシ、ヒツジ等の哺乳類偶蹄目の動物がよく利用されている。しかしながら、特に所望の蛋白質が比較的大きい場合又は所望の蛋白質の分泌量が多くなった場合は、乳腺が詰まって所望する蛋白質を体外に取り出せなくなる場合が多い。従って、効率のよい動物工場を実用化するためには、動物の乳腺を太くし、乳中に所望の蛋白質が多量に産生されても動物の乳腺が詰まらないようにする手段の開発が必要である。

本発明者はエピモルフィンがSCp2細胞の分岐した管構造への分化を誘導することに着目し、偶蹄目エピモルフィン遺伝子を単離すべく鋭意研究を行った。その結果、偶蹄目動物のエピモルフィン遺伝子を単離することに成功し、その遺伝子産物が該動物の乳腺を太くする作用、すなわち管の内径を大きくするように乳腺細胞を分化させる作用を有することを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質（本明細書において、「ウシエピモルフィン2」という場合がある。）；配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質（本明細書において「ウシエピモルフィン4」という場合がある。）、及び、配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質（本明細書において「ヒツジエピモルフィン2」という場合がある。）を提供するものである。また、本発明により、配列表の配列番号1（ウシエピモルフィン2）に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列と95%以上のホモロジーを有する蛋白質；配列表の配列番号1に記載

のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列を有する蛋白質；及び配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列を有する蛋白質が提供される。

さらに、配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ哺乳類動物由来のミルクプロテインを生産する細胞、好ましくは偶蹄目動物由来のミルクプロテインを生産する細胞において分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質；及び配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ哺乳類動物、好ましくは偶蹄目動物の毛の伸長を促進する蛋白質が提供される。

さらにまた、配列表の配列番号1又は配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなり、かつ配列表の配列番号1又は配列番号5に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列と95%以上のホモロジーを有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質；及び配列表の配列番号1又は配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなり、かつ配列表の配列番号1又は配列番号5に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列と95%以上のホモロジーを有し、かつ毛の伸長を促進する蛋白質が提供される。

別の観点からは、本発明により、上記の各蛋白質をコードするポリヌクレオチドが提供される。この発明の好ましい態様によれば、配列番号2、配列番号4、及び配列番号6に記載のDNAが提供される。また、これらの配列表に記載の塩基配列のうちの連続する12以上の塩基からなるDNAが提供される。このDNAは二本鎖又は一本鎖のいずれでもよく、一本鎖の場合にはセンス鎖又はアンチ

センス鎖のいずれであってもよい。また、上記のDNAにハイブリダイズするRNA；さらに上記ポリヌクレオチドを化学修飾したポリヌクレオチドも本発明により提供される。

さらに、本発明により、上記ポリヌクレオチドを含む組換えベクター、該ベクターを含む微生物細胞又は哺乳類動物細胞などの形質転換細胞、及び該形質転換体を培養した培養物から上記蛋白質を分離・精製する工程を含む、上記蛋白質の製造方法が提供される。また、上記の各蛋白質を認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体が本発明により提供される。

#### 発明を実施するための好ましい形態

従来、エピモルフィンには、3つのアイソフォームがあることが知られている(Hirai, Y., et al., J. Cell Biol., 140, pp.159-169, 1998)。これらのアイソフォームは、C末端部分のアミノ酸の数および性質（疎水性又は親水性）によりアイソフォーム1、2、3に分類されている。上記分類に従えば、本発明の蛋白質の好適な例である配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるウシエピモルフィン2、及び配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるヒツジエピモルフィン2は、それぞれ上記のアイソフォーム2に相当するものであると分類される。配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるウシエピモルフィン4は、上記の分類のいずれにも合致せず、従来知られていない新しいタイプのアイソフォームである。

エピモルフィンは、構造上、4つのドメインに分けることができる。本明細書においても本発明のエピモルフィンを構造上4つの部分に分け、それぞれをN末端側から順にドメイン1、ドメイン2、ドメイン3、ドメイン4と呼ぶ。上記のウシエピモルフィン2、ウシエピモルフィン4、及びヒツジエピモルフィン2におけるドメイン1～4は以下のとおりである（配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を単に「アミノ酸配列1」といい、他の配列についても同様である。）。

## ウシエピモルフィン 2

ドメイン 1 : アミノ酸配列 1 の 1 番目から 1 0 7 番目

ドメイン 2 : アミノ酸配列 1 の 1 0 8 番目から 1 8 7 番目

ドメイン 3 : アミノ酸配列 1 の 1 8 8 番目から 2 6 2 番目

ドメイン 4 : アミノ酸配列 1 の 2 6 3 番目から 2 8 7 番目

## ウシエピモルフィン 4

ドメイン 1 : アミノ酸配列 3 の 1 番目から 1 0 7 番目

ドメイン 2 : アミノ酸配列 3 の 1 0 8 番目から 1 8 7 番目

ドメイン 3 : アミノ酸配列 3 の 1 8 8 番目から 2 6 2 番目

ドメイン 4 : アミノ酸配列 3 の 2 6 3 番目から 2 6 9 番目

## ヒツジエピモルフィン 2

ドメイン 1 : アミノ酸配列 5 の 1 番目から 1 0 7 番目

ドメイン 2 : アミノ酸配列 5 の 1 0 8 番目から 1 8 7 番目

ドメイン 3 : アミノ酸配列 5 の 1 8 8 番目から 2 6 2 番目

ドメイン 4 : アミノ酸配列 5 の 2 6 3 番目から 2 8 7 番目

ドメイン 1 とドメイン 3 はコイルドコイル領域であり、それぞれ、N側コイルドコイル領域、C側コイルドコイル領域とよばれている。ドメイン 4 は疎水性領域であり、C末端疎水性領域と呼ばれる。ヒトおよびマウスエピモルフィンの知見から、各ドメインは、以下の機能を有することが知られている。

ドメイン 1 : 胎児上顎皮膚での毛の分化促進、胎児肺の管腔構造への分化促進、及び間充細胞の活性化、並びに I L - 6 及び I L - 8 のサイトカイン分泌促進。

ドメイン 2 : 細胞接着と G M - C S F (成長因子、サイトカインの一種) の分泌促進。

ドメイン 3 : 機能未知

ドメイン 4 : タイプ 1 の細胞膜結合ドメイン

ミルクプロテインを生産する細胞の管腔構造の分化促進は、ドメイン 1 またはドメイン 2 の機能である。エピモルフィン及びこれらのドメインの機能は、既報



の方法で確認できる。なお、ウシエピモルフィン2、ウシエピモルフィン4、及びヒツジエピモルフィン2について説明した上記各ドメインに相当するポリペプチド、並びに上記各ドメインのアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、上記各ドメインと実質的に同様な生物作用を有するポリペプチドも本発明の範囲に包含される。

前記の3つのエピモルフィンについて、ウシエピモルフィン2の1番目から262番目までのアミノ酸配列とウシエピモルフィン4の1番目から262番目までのアミノ酸配列は完全に一致しており、このアミノ酸配列とヒツジエピモルフィン2の1番目から262番目までのアミノ酸配列とは、ホモロジーが99.2%と非常によく保存されている。従って、この部分のアミノ酸配列は偶蹄目エピモルフィンを特徴付けるアミノ酸配列であり、このアミノ酸配列からなる蛋白質は本発明の好ましい態様である。また、ウシエピモルフィン2の1番目から262番目までのアミノ酸配列と95%以上、好ましくは98%以上のホモロジーを有し、上記アミノ酸配列と実質的に等価な機能を有する蛋白質は、いずれも本発明の範囲に包含される。なお、ヒツジエピモルフィン2とヒトエピモルフィンとの1番目から262番目までのアミノ酸配列におけるホモロジーは94.3%であり、この場合もよく保存されている。ここで言うホモロジーとは、2つのアミノ酸配列を比較するとき、一方を基準にして他方をアライメントさせた場合に得られる最大値を言う。このようなアライメントは市販のコンピューターソフトウェアを使用することによって簡便に行うことができる。そのようなソフトウェアとしては、例えば、ソフトウェア開発社のジェネティクスーマックが挙げられる。

上記に説明した各蛋白質のほか、配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質、並びに、配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ毛の伸長を促進する

蛋白質も本発明の範囲に包含される（本明細書において、これらの蛋白質を「改変蛋白質」と呼ぶ場合がある。また、単に「本発明の蛋白質」という場合には、特に言及しない限り、これらの改変蛋白質をも包含する概念として用いる。）。ミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する作用については、J. Cell Biol., 140, pp.159-169, 1998 に記載された方法により確認することが可能である。また、従来公知のエピモルフィン類には毛の伸長を促進する作用があることが知られている（Hirai, Y., et al., Cell, 69, pp.471-481, 1992）。

このような改変蛋白質は、配列番号 1, 3、又は 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする DNA を有する大腸菌などを N-ニトロ-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンなどの薬剤を用いて突然変異処理し、菌体から改変蛋白質をコードする遺伝子を回収した後、通常の遺伝子発現操作を行うことによって製造できる。また、前記遺伝子を亜硫酸ナトリウムなどの薬剤で直接処理するか、あるいは部位特異的変異法（Kramer, W. et al., Methods in Enzymology, 154, 350, 1987）やりコンビナント PCR 法（PCR Technology, Stockton press, 1989）などの手法によってヌクレオチドの欠失、置換、又は付加を直接導入してもよい。

本発明の蛋白質をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されないが、例えば、本明細書の実施例に具体的に説明した方法により効率よく遺伝子 DNA を取得することができる。遺伝暗号の縮重により、ポリヌクレオチドから生産されたポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく、該ポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも一部の塩基を他の種類の塩基に置換することができることは当業者に周知である。従って、本発明のポリヌクレオチドには、配列番号 1, 3、又は 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするエピモルフィン遺伝子はすべて包含される。本発明の好ましい遺伝子の例として、配列表の配列番号 2、配列番号 4、及び配列番号 6 には、それぞれウシエピモルフィン 2、ウシエピモルフィン 4、及びヒツジエピモルフィン 2 をコードする遺伝子 DNA の具体例を示した。

本発明の範囲には、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチドおよびその誘導体が包含される。アンチセンスポリヌクレオチドは上記ポリヌクレオチドの一態様として提供されるが、本明細書において、特にアンチセンス鎖の塩基配列からなるポリヌクレオチドであることを明示する場合に「アンチセンスポリヌクレオチド」という場合がある。該アンチセンスポリヌクレオチドは、上記の各蛋白質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能であり、それがハイブリダイズするポリヌクレオチドがコード領域のポリヌクレオチドであれば、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの生合成を阻害することが可能である。

ポリペプチドの生合成を阻害するためのアンチセンスポリヌクレオチドは、12塩基以上からなることが好ましく、16塩基以上からなるものはさらに好ましい。一方、細胞内に全長のアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませるためには、必要以上に長い配列は好ましくない。細胞内にアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませ、上記蛋白質の生合成を阻害する場合には、12塩基以上30塩基以下、好ましくは15塩基以上25塩基以下、より好ましくは18塩基以上22塩基以下の塩基からなるアンチセンスポリヌクレオチドを用いるのがよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体には、天然に存在するか否かにかかわらず、塩基、リン酸、及び糖からなるヌクレオチドが複数結合したものが全て包含される。代表的なものは、天然型のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAである。非天然型のポリヌクレオチドとしては、例えば、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型などのポリヌクレオチドを挙げることができる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドについて、当業者に利用可能なアンチセンス技術を用いて、目的のDNAやmRNAとの結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性などに優れた様々なアンチセンスポリヌクレオチド誘導体を得られる。

一般的には、ハイブリダイズのし易さの点では、RNAのループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つアンチセンスポリヌクレオチドまた

はその誘導体を設計することが好ましい。また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、又はスプライス部位の配列に相補的な配列を有するようなアンチセンスポリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる。したがって、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体であって、上記の各蛋白質をコードする遺伝子またはmRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、及び／又はスプライス部位の相補的な配列を含むものは、発現抑制効果の観点から好ましい態様である。

現在、一般的に知られているポリヌクレオチド誘導体のうち、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも一が高められた誘導体として、好ましくはフォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体を挙げるることができる。本発明のポリヌクレオチドおよびその誘導体には、これらの機能または構造を有する誘導体が含まれる。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドのうち、天然型のアンチセンスポリヌクレオチドについては、化学合成機を使用して合成するか、上記の各蛋白質をコードするDNAを鋳型とするPCR法により製造することができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型などのポリヌクレオチド誘導体は、通常、化学合成により製造することができる。この場合には、化学合成機に添付されている説明書に従って操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することが可能である。

本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド、そのアンチセンスポリヌクレオチドまたはそれらの一部（連続する12塩基以上の塩基配列からなるポリヌクレオチド）であるポリヌクレオチドは、cDNAライブラリー等から本発明の遺伝子をスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。このような目的には、GC含有率が30ないし70%のものが好適に使用可能である。また、連続する16塩基以上の塩基配列からなるポリヌクレオチドが特に好ましい。プローブとして用いる該ポリヌクレオチドは誘導体であってもよい。通常、前記の塩基数以上の配列は特異性のある配列であると認識されている。

該プローブを用いたスクリーニングにおいて使用するcDNAライブラリーとしては、mRNAから作製されたものが好ましく使用できる。これらのcDNAライブラリーからランダムサンプリングにより選択された一群のcDNAを検索の試料とすることができる。また、市販のものも使用可能である。例えば、配列表の配列番号2、4、又は6に記載の塩基配列のうちの連続する12塩基以上の塩基配列からなるDNAまたは該DNAにハイブリダイズするポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチド）は、それぞれ配列番号1、3、又は5に記載のアミノ酸配列をコードするDNAをcDNAライブラリー等からスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。

また、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくはそのアンチセンスポリヌクレオチド、またはそれらの一部であるポリヌクレオチドをプローブとして、各組織由来のmRNAについてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うことにより、本発明の遺伝子由来のmRNAが発現している組織を見出すことが可能である。

本発明の遺伝子とハイブリダイズするcDNAを適当なベクターに挿入した後、宿主（例えば大腸菌）に導入することで形質転換体を作製することができる。ベクターの種類及び宿主の種類は特に限定されないが、宿主の種類に応じて適宜の発現用ベクターを選択して用いることが可能である。宿主としては、大腸菌等の細菌類、酵母、又は動物細胞のいずれも使用可能であるが、動物細胞を用いることが好ましく、哺乳類動物細胞を用いることが特に好ましい。組換えベクターを大腸菌等の適当な宿主に導入して形質転換体を得る方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。

本発明の遺伝子を導入した形質転換体を培養して遺伝子DNAの増幅または蛋白質の発現を行わせ、本発明の蛋白質を製造することが可能である。形質転換体の製造及び培養については各種の成書及び報告があり、種々の手段が開発され、当業界で汎用されている。従って、当業者は本明細書に記載された塩基配列に基づいて本発明の蛋白質を容易に製造することが可能である。細胞に遺伝子を導入

する手法として、塩化カルシウム法、プロトプラスト法、エレクトロポーレーション法などを用いることができる。特に、核内微量注入法を用いることが好ましい。

培養物から目的蛋白質の分離及び精製は当業者に利用可能な手段を適宜組み合わせで行うことができる。例えば、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行うことにより、本発明の蛋白質を効率よく回収及び精製することが可能である。より具体的には、免疫沈降法、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法や抗体クロマトグラフィー法等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー法、及び逆相クロマトグラフィー法などを適宜選択して行えばよい。

また、本発明の蛋白質は、他のポリペプチドとの融合ペプチドとして製造することも可能である。このような融合ペプチドも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。融合すべきポリペプチドの種類は特に限定されないが、例えば、細胞外分泌を促進するシグナルペプチドなどを挙げることができる。このような融合蛋白質の製造も形質転換体を用いて行うことができる。融合蛋白質を用いて本発明の蛋白質又は改変蛋白質を製造する場合には、融合蛋白質をブロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理し、切り出された目的物を分離及び精製すればよい。

また、本発明の蛋白質又は改変蛋白質においてエピモルフィン様の生物活性を担う部分ポリペプチド（いわゆる活性ドメイン）と他のポリペプチドとの融合蛋白質を製造することも可能である。このような活性ドメインとしては、例えば、上記のドメイン1及び／又はドメイン2を用いることができる。例えば、ドメイン4を除去することにより活性ドメインを含む可溶性ポリペプチドを製造することができ、このように可溶化された活性ドメインと他のポリペプチド（例えばシグナルペプチド）との融合蛋白質を製造することができる。なお、本発明の蛋白質の上記各ドメイン及び他の種のエピモルフィンの各ドメインから選ばれる複数

のドメインを適宜組み合わせさせてキメラ型のエピモルフィンを製造してもよい。また上記の各ドメインを適宜組み合わせたポリペプチドに対して、さらに他のポリペプチドを結合して融合蛋白質を製造してもよい。

本発明の蛋白質又はそれらの部分ポリペプチド鎖を用いて、本発明の蛋白質を認識する抗体を製造することができる。本発明の抗体は、哺乳類動物を本発明の蛋白質で免疫感作することによって当業界で汎用の方法に従って製造できる。該抗体が本発明の蛋白質を認識することは、ウェスタンブロット法、E L I S A法、又は免疫染色法(例えばF A C Sでの測定)等により確認することが可能である。免疫原としては、本発明の蛋白質のほか、それらの一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いてもよい。この場合、本発明の蛋白質の一部は8アミノ酸残基以上であることが好ましく、このようなポリペプチドは、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。

また、免疫した動物のリンパ球を用いて製造したハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を本発明の抗体として用いてもよい。モノクローナル抗体の製造方法については当業界で周知されており、かつ汎用されている(『Ant i b o d i e s A L a b o r a t o r y M a n u a l』(C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、1988) C h a p t e r 6)。また、本発明の抗体として、上記の抗体の活性フラグメントを用いることも可能である。本明細書において、活性フラグメントとは抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味しており、具体的には、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ などを挙げることができる。例えば、本発明の抗体をペプシンで分解すると $F(a b')$ が得られ、パパインで分解すると $F a b$ が得られる。 $F(a b')$ を2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化すると $F a b'$ が得られる。 $F v$ は重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカーで結合させた一価の抗体活性フラグメントである。これらの活性フラグメントを保持し、その他の部分を他の動物のフラグメントに置換することでキメラ抗体が得られる。上記に説明した抗体及び活性フラグメントな

どは、いずれも本発明の範囲に包含される。

本発明の蛋白質は、抗体を用いる方法又は酵素反応を利用する方法などに従って検出可能である。抗体を用いて本発明の蛋白質を検出する方法としては、具体的には、(I)標識された上記抗体を用いて本発明の蛋白質を検出する方法、(II)上記抗体および該抗体の標識二次抗体を用いて本発明の蛋白質を検出する方法が挙げられる。標識としては、例えば放射性同位元素 (R I)、酵素、アビジンもしくはビオチン、または蛍光物質 (F I T Cやローダミン等) が利用される。酵素反応を利用する方法としては、例えば、E L I S A法、免疫凝集法、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリーを用いた免疫反応分子の同定方法又はそれらに類似する方法が挙げられる。

#### 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

本発明のヒッジ及びウシエピモルフィン遺伝子を、以下に記載の方法により、取得した。

##### (1) エピモルフィン cDNA の単離

1) プローブとするDNAをRandom Primed DNA labeling Kit (ベーリンガー社製) を用いて取扱説明書の通りに標識した。プローブとするDNAは、マウスエピモルフィンのコード領域の全長の塩基配列からなるDNAを使用した。

2) 次に、下記の組成のDNA反応液を調製し、この液を37℃で30分間インキュベートした後、65℃で10分間熱処理し、酵素を失活させた。

DNAプローブ (50 ng/μl)	2 μl
H <sub>2</sub> O	7 μl
dNTPs	3 μl
[α- <sup>32</sup> P] d-CTP (370 MBq/ml) (アマシャム社製)	5 μl



Primer	2 $\mu$ l
Klenow enzyme	1 $\mu$ l
	合計 20 $\mu$ l

3)  $H_2O$ で膨潤させたCentri-Sepスピンカラム (プリンストンセパレーション社製) で遠心して、標識化DNAプローブを得た。

4) ライブラリーはヒツジ肺及びウシ肺を使い (Uni-ZAPXR Library, STRATAGENE社製)、常法によりファージブランクを得た。

5) 3) で得られた標識化DNAプローブをシンチレーションカウンターで測定し、 $1 \times 10^6$  cpm/mlになるようにハイブリダイゼーション反応液に加え、ブランク由来のcDNAを固定したナイロンメンブレン (アマシャム社製、Hybond-N+) と反応させた。

プレハイブリダイゼーション

反応液 ExpressHyb (クローンテック社製)

反応温度 68°C

反応時間 30分間

ハイブリダイゼーション

反応液 ExpressHyb (クローンテック社製)

$^{32}P$  標識cDNAプローブ  $1 \times 10^6$  cpm/ml

反応温度 68°C

反応時間 1時間

6) ハイブリダイズの終了したメンブレンを以下の液でExpressHyb (クローンテック社製) のプロトコール通りに洗浄した。

2  $\times$  SSC、0.05% SDS      500 ml

室温

時間 40分間

0.1  $\times$  SSC、0.1% SDS

50°C

時間 40 分間

- 7) 洗浄したナイロンメンブレンをX線フィルム（例えば、コダック社製XAR 5フィルム）に $-80^{\circ}\text{C}$ で一晩露光し、オートラジオグラフを撮影した。
- 8) 得られたオートラジオグラフから、陽性のブランクの位置を決定し、対応する寒天上のブランク中のファージをSM溶液に回収した。
- 9) 回収したファージは、常法により再度NZY寒天培地上にブランク形成を行わせ、ナイロンメンブレン上に固定した。
- 10) 5) ~ 9) の過程を3回繰り返す、陽性のブランク中のファージを単一なものにした。該ファージを回収し、 $500\mu\text{l}$ のSM溶液に懸濁し、 $20\mu\text{l}$ のクロロホルムを加えて攪拌し、ファージ液を作製した。該ファージ液から単離したcDNAにヒッジ及びウシエピモルフィン遺伝子が含まれていた。

## (2) ヒッジ及びウシエピモルフィンcDNAの大量調製

- 1) SM溶液に懸濁したファージ液 $10\mu\text{l}$ とXL1-Blue大腸菌（ストラタジーン社製） $200\mu\text{l}$ とヘルパーファージ（ストラタジーン社製） $1\mu\text{l}$ を混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、15分間反応させた。
- 2) その後、 $3\text{ml}$  LB培地に1) で混合した溶液を移し、 $37^{\circ}\text{C}$ で1晩振とうすることにより遺伝子をpBluescript phagemidとして切り出した。
- 3)  $70^{\circ}\text{C}$ で20分間処理した後、 $1000\text{rpm}$ 、15分間遠心分離し、上清を回収した。
- 4) 上清 $100\mu\text{l}$ とSOLR大腸菌 $200\mu\text{l}$ を混合し $37^{\circ}\text{C}$ で15分間反応させた。
- 5) その後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB培地のプレートに4) で反応した溶液 $10\mu\text{l}$ をまき、 $37^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。
- 6) 1コロニーを $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB培地 $3\text{ml}$ に加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で1晩振とう培養した。

7) 2000rpm、10分間遠心分離し大腸菌を回収した。

8) Plasmid Mini Kit (QIAGEN社製) を使って精製し、ヒツジ又はウシエピモルフィン遺伝子を含んだプラスミドDNAを大量に調製した。

### (3) ヒツジ及びウシエピモルフィンcDNAの塩基配列の決定

オートシーケンサーを用いたダイターミネーター法によりプラスミドDNA中のヒツジ及びウシエピモルフィン遺伝子の全塩基配列を決定した。

### (4) アミノ酸配列の決定

上記3. で決定した塩基配列から、ヒツジ及びウシエピモルフィンのアミノ酸配列を決定した（このためのコンピューターソフトウェアはジェネティクスーマック（ソフトウェア開発社製）を使用した）。

それぞれのアミノ酸配列から、ヒツジエピモルフィン2、ウシエピモルフィン2、ウシエピモルフィン4とそれぞれ名付けた。

### (5) 形質転換体の作製

ヒツジエピモルフィン2、ウシエピモルフィン2およびウシエピモルフィン4それぞれのcDNAをpBluescript SK (-) プラスミドに挿入し、大腸菌SOLR株に導入して形質転換体を作製した。これらを、それぞれSh-EPM2、Bo-EPM2、Bo-EPM4と名付けた。

### 産業上の利用の可能性

本発明の蛋白質は、エピモルフィン様の生物活性、例えば、ミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する作用、及び毛の伸長を促進する作用を発揮できる。本発明の蛋白質は、偶蹄目動物に対する医薬又は動物改質剤として用いることが可能である。例えば、ウシやヒツジなどの偶蹄目動物

の乳腺を太くし、乳腺の詰まりを防いで該動物の乳中に分泌される所望の蛋白質の収量を増やすことができる。また、本発明の遺伝子を用いて、羊毛の生産性の高いヒツジや、目的蛋白質の生産性の高い遺伝子導入動物（動物工場）を産生することが可能である。

## 請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 にいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質。
2. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列と 95% 以上のホモロジーを有する蛋白質。
3. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 2 項に記載の蛋白質。
4. 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 2 項に記載の蛋白質。
5. 配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質。
6. 配列表の配列番号 1 又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなり、かつ配列表の配列番号 1 又は配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列と 95% 以上のホモロジーを有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質。
7. 配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ毛の伸長を促進する蛋白質。
8. 配列表の配列番号 1 又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなり、かつ配列表の配列番号 1 又は配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列と 95% 以上のホ

モロジエを有し、かつ毛の伸長を促進する蛋白質。

9. 請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項に記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

10. 配列番号2、配列番号4、又は配列番号6のいずれかに記載のDNAである請求の範囲第9項に記載のポリヌクレオチド。

11. 請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項に記載の蛋白質を認識する抗体。

## 要 約 書

本発明により、ウシやヒツジなどの偶蹄目動物においてミルクプロテインを生産する細胞に対して分岐した管腔構造への分化を誘導する作用を有する配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質エピモルフィン及び該蛋白質をコードする遺伝子が提供される。本発明の蛋白質エピモルフィンは、偶蹄目動物に対する医薬又は動物改質剤として用いることができ、例えば、ウシやヒツジなどの乳腺を太くし、乳腺の詰まりを防いで動物の乳中に分泌される所望の蛋白質の収量を増やすことができる。

# Sequence Listing

<110> Sumitomo Electric Industries, Co., Ltd.

<120> Artiodactyla epimorphin

<130> 99044M

<160> 6

<210> 1

<211> 287

<212> PRT

<213> Bos

<400> 1

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp

5 10 15

Gly Asp Thr Thr Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe

20 25 30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Ala Lys Ile Ala Gln

35 40 45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro

50 55 60

Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu

65 70 75 80

Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Thr Lys Leu Lys Ser Ile Glu

85 90 95

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Gly Gly Asn Arg Thr Ser Val Glu Leu

100 105 110

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu

115 120 125



Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
 130 135 140

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Lys Thr Thr Thr  
 145 150 155 160

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ile Phe  
 165 170 175

Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
 180 185 190

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile  
 195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
 210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Lys Asn Val Met Asn Ala Ala  
 225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
 245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Met Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Val  
 260 265 270

Ile Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser  
 275 280 285

<210> 2

<211> 864

<212> DNA

<213> Bos

<400> 2

ATG CGG GAC CGG CTG CCG GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAA AAT GAT GAT 48

GGG GAC ACA ACT GTT GTT GTT GAA AAG GAC CAT TTT ATG GAT GAT TTC 96

TTC CAT CAG GTC GAG GAG ATC AGA AAC AGT ATA GCG AAA ATA GCT CAG	144
TAT GTC GAA GAA GTG AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA	192
AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAG GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA	240
ATC AAG AAA ACT GCT AAT AAA ATA AGG ACT AAG TTG AAG TCT ATT GAA	288
CAG AGT TTT GAT CAG GAT GAG GGT GGA AAC CGA ACT TCT GTG GAG CTT	336
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCA GTG CTA TCT CGA AAG TTT GTG GAA	384
GTC ATG ACA GAA TAT AAC GAA GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGA AGC	432
AAA GGC CGT ATA CAG CGT CAG CTA GAA ATA ACT GGA AAA ACT ACC ACC	480
GAT GAT GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAA AGT GGG AAT CCC TCC ATC TTC	528
ACG TCA GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAG GCT CTC AAT	576
GAA ATT GAG TCC CGT CAT AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACA AGC ATC	624
CGT GAG CTA CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCC ATG TTC GTC GAG ACT	672
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AAA AAT GTT ATG AAT GCC GCA	720
GAC TAT GTA GAA CAT GCA AAA GAA GAA ACG AAG AAA GCT ATT AAA TAT	768
CAA AGC AAA GCA AGA AGG AAA ATG ATG TTC ATT ATT ATT TGT GTA GTT	816
ATT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG	864

<210> 3

<211> 269

<212> PRT

<213> Bos

<400> 3

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp

5

10

15

Gly Asp Thr Thr Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe

20

25

30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Ala Lys Ile Ala Gln

35

40

45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro  
 50 55 60  
 Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Thr Lys Leu Lys Ser Ile Glu  
 85 90 95  
 Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Gly Gly Asn Arg Thr Ser Val Glu Leu  
 100 105 110  
 Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu  
 115 120 125  
 Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
 130 135 140  
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Lys Thr Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ile Phe  
 165 170 175  
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
 180 185 190  
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile  
 195 200 205  
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
 210 215 220  
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Lys Asn Val Met Asn Ala Ala  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
 245 250 255  
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Val Ser Leu Val Phe Gln Ser

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 810

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bos

&lt;400&gt; 4

ATG CGG GAC CGG CTG CCG GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAA AAT GAT GAT	48
GGG GAC ACA ACT GTT GTT GTT GAA AAG GAC CAT TTT ATG GAT GAT TTC	96
TTC CAT CAG GTC GAG GAG ATC AGA AAC AGT ATA GCG AAA ATA GCT CAG	144
TAT GTC GAA GAA GTG AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA	192
AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAG GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA	240
ATC AAG AAA ACT GCT AAT AAA ATA AGG ACT AAG TTG AAG TCT ATT GAA	288
CAG AGT TTT GAT CAG GAT GAG GGT GGA AAC CGA ACT TCT GTG GAG CTT	336
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCA GTG CTA TCT CGA AAG TTT GTG GAA	384
GTC ATG ACA GAA TAT AAC GAA GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGA AGC	432
AAA GGC CGT ATA CAG CGT CAG CTA GAA ATA ACT GGA AAA ACT ACC ACC	480
GAT GAT GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAA AGT GGG AAT CCC TCC ATC TTC	528
ACG TCA GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAG GCT CTC AAT	576
GAA ATT GAG TCC CGT CAT AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACA AGC ATC	624
CGT GAG CTA CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCC ATG TTC GTC GAG ACT	672
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AAA AAT GTT ATG AAT GCC GCA	720
GAC TAT GTA GAA CAT GCA AAA GAA GAA ACG AAG AAA GCT ATT AAA TAT	768
CAA AGC AAA GCA AGA AGG GTG AGT TTG GTC TTT CAG AGT TGA	810

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 287

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Ovis

<400> 5

Met	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Asn	Asp	Asp
1				5					10					15	
Gly	Asp	Thr	Thr	Val	Val	Val	Glu	Lys	Asp	His	Phe	Met	Asp	Asp	Phe
				20					25					30	
Phe	His	Gln	Val	Glu	Glu	Ile	Arg	Asn	Ser	Ile	Ala	Lys	Ile	Ala	Gln
				35				40						45	
Tyr	Val	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Asn	His	Ser	Ile	Ile	Leu	Ser	Ala	Pro
				50			55					60			
Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Ile	Lys	Glu	Glu	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Glu
65					70					75					80
Ile	Lys	Lys	Thr	Ala	Asn	Lys	Ile	Arg	Thr	Lys	Leu	Lys	Ser	Ile	Glu
					85					90					95
Gln	Ser	Phe	Asp	Gln	Asp	Glu	Gly	Gly	Asn	Arg	Thr	Ser	Val	Glu	Leu
				100					105					110	
Arg	Ile	Arg	Arg	Thr	Gln	His	Ser	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Phe	Val	Glu
				115					120					125	
Val	Met	Thr	Glu	Phe	Asn	Glu	Ala	Gln	Thr	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg	Ser
				130				135				140			
Lys	Gly	Arg	Ile	Gln	Arg	Gln	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr
145					150					155					160
Asp	Asp	Glu	Leu	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Ser	Gly	Asn	Pro	Ser	Ile	Phe
				165						170					175
Thr	Ser	Asp	Ile	Ile	Ser	Asp	Ser	Gln	Ile	Thr	Arg	Gln	Ala	Leu	Asn
				180					185					190	
Glu	Ile	Glu	Ser	Arg	His	Lys	Asp	Ile	Met	Lys	Leu	Glu	Thr	Ser	Ile
				195					200					205	

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
 210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Lys Asn Val Thr Asn Ala Ala  
 225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
 245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Met Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Val  
 260 265 270

Ile Leu Leu Val Ile Phe Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser  
 275 280 285

<210> 6

<211> 864

<212> DNA

<213> Ovis

<400> 6

ATG CGG GAC CGG CTG CCG GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAA AAT GAT GAT	48
GGG GAC ACA ACT GTT GTT GTT GAA AAG GAC CAT TTT ATG GAT GAT TTC	96
TTC CAT CAG GTC GAG GAG ATC AGA AAC AGT ATA GCA AAA ATA GCT CAG	144
TAT GTC GAA GAA GTG AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA	192
AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAG GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA	240
ATC AAG AAA ACT GCC AAT AAA ATT CGG ACT AAG TTG AAG TCT ATT GAA	288
CAG AGT TTT GAT CAG GAT GAG GGT GGA AAC CGA ACT TCT GTG GAG CTT	336
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCA GTG CTA TCT CGA AAG TTT GTG GAA	384
GTC ATG ACA GAA TTT AAT GAA GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGA AGC	432
AAA GGC CGT ATA CAG CGT CAG CTA GAA ATA ACT GGA AAA ACT ACC ACC	480
GAT GAT GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAA AGT GGG AAT CCC TCC ATC TTC	528
ACG TCA GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGA CAG GCT CTG AAT	576

GAA ATT GAG TCC CGT CAT AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACG AGC ATC	624
CGT GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCC ATG TTC GTC GAG ACC	672
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AAA AAT GTT ACG AAT GCC GCA	720
GAC TAT GTT GAG CAT GCT AAA GAA GAA ACG AAG AAA GCC ATT AAA TAT	768
CAA AGC AAA GCA AGA AGG AAA ATG ATG TTC ATT ATT ATC TGT GTA GTT	816
ATT TTG CTT GTG ATC TTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG	864

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

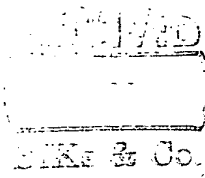
今村 正純

あて名

〒 104-0031

東京都中央区京橋1丁目5番5号

KRFビル5階



PCT見解書

(法第13条)

[PCT規則66]

発送日  
(日.月.年)

25.04.00

出願人又は代理人  
の書類記号

99044M

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/J P 99/04479

国際出願日

(日.月.年) 20.08.99

優先日

(日.月.年) 20.08.98

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, 16/18

出願人 (氏名又は名称)

住友電気工業株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に応答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合にに限られることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 20.12.00 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4 B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 6289



## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1, 3-8, 10	有
	請求の範囲	2, 9, 11	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-11	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-11	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

請求の範囲 2, 9, 11 は、国際調査報告で引用された文献 1 (特開平06-025295号公報) に記載されているので新規性を有さない。

請求の範囲 1 乃至 11 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献 1 (特開平06-025295号公報)、文献 2 (特開平09-065885号公報) 及び文献 3 (特開平08-325293号公報) とにより進歩性を有さない。

国際調査報告で引用した文献 1 (特開平06-025295号公報) には、ヒト及びマウス由来のエピモルフィン及びそれをコードする DNA、エピモルフィンに対する抗体を製造することが記載されているから、マウスとヒトの DNA 塩基配列をもとにプライマーを作成し、マウスやヒトと同様に哺乳動物であるウシやヒツジ由来のエピモルフィンをコードする DNA を得、該 DNA を用いて蛋白質を製造し、該蛋白質に対する抗体を製造することは、当業者が容易に想到し得るものと認められる。

また、国際調査報告で引用した文献 2 (特開平09-065885号公報) 及び文献 3 (特開平08-325293号公報) には、エピモルフィンのアミノ酸を欠失、置換、付加して変異体を製造することが記載されているから、上記得られたウシやヒツジ由来のエピモルフィンの変異体を製造することにも格別の困難性は見いだせない。

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 99044M	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04479	International filing date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)	Priority date (day/month/year) 20 August 1998 (20.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/00, C07K 14/47, 16/18		
Applicant SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 February 2000 (18.02.00)	Date of completion of this report 20 November 2000 (20.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04479

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 99/04479

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 3-8, 10	YES
	Claims	2, 9, 11	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: JP, 6-25295, A (Biomedical Research Institute Co., Ltd.), February 1, 1994 (01.02.94)

Document 2: JP, 9-65885, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), March 11, 1997 (11.03.97)

Document 3: JP, 8-325293, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), December 10, 1996 (10.12.96)

#### Claims 2, 9 and 11

The inventions disclosed in Claims 2, 9 and 11 lack novelty in the light of Document 1 cited in the international search report.

Document 1 discloses the preparation of human-derived and mouse-derived epimorphines, DNA coding for the same and their corresponding antibodies.

#### Claims 1 to 11

The inventions disclosed in Claims 1 to 11 do not involve an inventive step in the light of Documents 1 to 3.

Based on the mouse-derived and human-derived DNA base sequence disclosed in Document 1, it would be easy for a person skilled in the art to produce a primer, obtain DNA coding for epimorphines derived from mammals other than mice and humans, such as cows and sheep, use said DNA to

prepare a protein and to manufacture an antibody to said protein. Moreover, Documents 2 and 3 also disclose the feature of producing a modification in which the amino acids of the epimorphine have been omitted, replaced or supplemented. Therefore, it would be easy for a person skilled in the art to conceive of producing a modification of the cow-derived or sheep-derived epimorphine obtained as described above.

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 99044M	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04479	国際出願日 (日.月.年) 20.08.99	優先日 (日.月.年) 20.08.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18		
出願人 (氏名又は名称) 住友電気工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.02.00	国際予備審査報告を作成した日 20.11.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9549

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	1, 3-8, 10	有
請求の範囲	2, 9, 11	無

進歩性(I S)

請求の範囲		有
請求の範囲	1-11	無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲	1-11	有
請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: JP, 6-25295, A (株式会社バイオマテリアル研究所) 1.2月.1994 (01.02.94)  
文献2: JP, 9-65885, A (住友電気工業株式会社) 11.3月.1997 (11.03.97)  
文献3: JP, 8-325293, A (住友電気工業株式会社) 10.12月.1996 (10.12.96)

## 請求の範囲2, 9, 11

請求の範囲2, 9及び11記載の発明は、国際調査報告で引用された文献1により新規性を有さない。

文献1には、ヒト及びマウス由来のエピモルフィン及びそれをコードするDNA、それに対する抗体を製造することが記載されている。

## 請求の範囲1-11

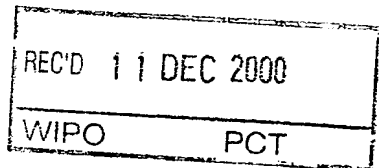
請求の範囲1-11記載の発明は、国際調査報告で引用された文献1-3により進歩性を有さない。

文献1のマウスとヒト由来のDNAの塩基配列をもとにしてプライマーを作成し、マウスやヒトと同じ哺乳動物であるウシやヒツジ由来のエピモルフィンをコードするDNAを取得し、該DNAを用いて蛋白質を製造し、該蛋白質に対する抗体を作製することは、当業者が容易に想到し得ることである。また、文献2及び3には、エピモルフィンのアミノ酸を欠失、置換、付加した変異体を作成することも記載されているから、上記のようにして得られたウシやヒツジ由来のエピモルフィンの変異体を作成しようとすることも、当業者が容易に想到し得ることである。

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕



出願人又は代理人 の書類記号 99044M	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP99/04479	国際出願日 (日.月.年) 20.08.99	優先日 (日.月.年) 20.08.98	
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18			
出願人 (氏名又は名称) 住友電気工業株式会社			

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.02.00	国際予備審査報告を作成した日 20.11.00		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進	4N	9549
	電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)という翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)という国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3という翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1, 3-8, 10	有
	請求の範囲	2, 9, 11	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-11	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-11	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: JP, 6-25295, A (株式会社バイオマテリアル研究所) 1.2月.1994 (01.02.94)  
 文献2: JP, 9-65885, A (住友電気工業株式会社) 11.3月.1997 (11.03.97)  
 文献3: JP, 8-325293, A (住友電気工業株式会社) 10.12月.1996 (10.12.96)

請求の範囲2, 9, 11

請求の範囲2, 9及び11記載の発明は、国際調査報告で引用された文献1により新規性を有さない。

文献1には、ヒト及びマウス由来のエピモルフィン及びそれをコードするDNA、それに対する抗体を製造することが記載されている。

請求の範囲1-11

請求の範囲1-11記載の発明は、国際調査報告で引用された文献1-3により進歩性を有さない。

文献1のマウスとヒト由来のDNAの塩基配列をもとにしてプライマーを作成し、マウスやヒトと同じ哺乳動物であるウシやヒツジ由来のエピモルフィンをコードするDNAを取得し、該DNAを用いて蛋白質を製造し、該蛋白質に対する抗体を作製することは、当業者が容易に想到し得ることである。また、文献2及び3には、エピモルフィンのアミノ酸を欠失、置換、付加した変異体を作成することも記載されているから、上記のようにして得られたウシやヒツジ由来のエピモルフィンの変異体を作成しようとすることも、当業者が容易に想到し得ることである。

EP



PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 99044M	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04479	国際出願日 (日.月.年) 20.08.99	優先日 (日.月.年) 20.08.98
出願人(氏名又は名称) 住友電気工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/00, C07K14/47, 16/18

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/00, C07K14/47, 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN), GeneBank, EMBL, DDBJ, PIR, SwissProt, Genseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 6-25295, A, (株式会社バイオマテリアル研究所), 1. 2月. 1994 (01. 02. 94), 特許請求の範囲及び実施例参照, & WO, 93/8213, A1 & EP, 562123, A1 & US, 5726298, A & DE, 69229219, A1	1-4, 9-11 5-8
Y	JP, 9-65885, A, (住友電気工業株式会社), 11. 3月. 1997 (11. 03. 97), 特許請求の範囲及び実施例参照, (ファミリーなし)	5-8
Y	JP, 8-325293, A, (住友電気工業株式会社), 10. 12月. 1996 (10. 12. 96), 特許請求の範囲及び実施例参照, & EP, 698666, A2 & CA, 2152210, A	5-8

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 11. 99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

mk



<b>(51) 国際特許分類6</b> C12N 15/00, C07K 14/47, 16/18	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> WO00/11146  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年3月2日(02.03.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/04479 <b>(22) 国際出願日</b> 1999年8月20日(20.08.99) <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/233892 1998年8月20日(20.08.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 津金沢恵子(TSUGANEZAWA, Keiko)[JP/JP] 〒244-8588 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社 横浜製作所内 Kanagawa, (JP) <b>(74) 代理人</b> 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AU, CA, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54)Title: ARTIODACTYL EPIMORPHINE</b>  <b>(54)発明の名称</b> 偶蹄目エピモルフィン  <b>(57) Abstract</b> A protein epimorphine having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in Sequence Listing which has an effect of inducing the differentiation of milk protein-producing cells of artiodactyls (cow, sheep, etc.) into a branched duct structure; and a gene encoding this protein. This epimorphine is usable as a drug or a modifying agent for artiodactyls. By using it, for example, cow or sheep mammary glands can be thickened and plugging in mammary glands can be prevented so that the yield of a desired protein secreted into the animal milk can be elevated.		

# (57)要約

本発明により、ウシやヒツジなどの偶蹄目動物においてミルクプロテインを生産する細胞に対して分岐した管腔構造への分化を誘導する作用を有する配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質エビモルフィン及び該蛋白質をコードする遺伝子が提供される。本発明の蛋白質エビモルフィンは、偶蹄目動物に対する医薬又は動物改質剤として用いることができ、例えば、ウシやヒツジなどの乳腺を太くし、乳腺の詰まりを防いで動物の乳中に分泌される所望の蛋白質の収量を増やすことができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NO	ノルウェー		南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZA	
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		



## 明 細 書

## 偶蹄目エピモルフィン

## 技術分野

本発明は、ブタ、ウシ、ヒツジなどの偶蹄目由来のエピモルフィンに関する。

## 背景技術

動物の諸器官は上皮組織がその形態を構築し、その周りに間充織細胞が存在しているが、エピモルフィンは、間充織細胞の特に上皮細胞の近傍に多く発現している細胞膜蛋白である (Hirai, Y., et al., Cell, 69, pp.471-481, 1992)。上皮組織の形態形成の進行には、間充織細胞からのシグナルが必要であると言われている (Gumbiner, B.M., Cell., 69, pp.385-387, 1992)。エピモルフィンは、マウスの他にヒト、トリ及びラットでクローニングされており、疎水性部位の配列が異なるアイソフォームが存在することが知られている (Zha, H., et al., Genomics, 37, pp.386-389, 1996; Hirai, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 191, pp.1332-1337, 1993; Oka, Y., 発生生物学会, 1997年5月)。

エピモルフィンは、マウスにおいては胎児上顎皮膚での毛の分化、胎児肺の管腔構造への分化という上皮組織の形態形成作用に深く関わっていることが知られている (Hirai, Y., et al., Cell, 69, pp.471-481, 1992; Koshida, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 234, pp.522-525, 1997)。また、間充織細胞を活性化し、IL-6、IL-8のサイトカイン分泌を促進している (Oka, Y., et al., Exp. Cell Res., 222, pp.189-198, 1996)。最近では、ミルクプロテインを生産するSCp2細胞にエピモルフィンを加えると該細胞が増殖して分岐した管腔構造を形成することが明らかになっている (Hirai, Y., et al., J. Cell Biol., 140, pp.159-169, 1998)。エピモルフィンは、臓器の異常に起因する疾患の発症機序の解明、診断法、治療法の開発、毛や管腔・骨・歯の形成、血管の新生ある

いは新たな創傷治療法の開発に有効であることが期待されている (Zha, H., et al., Genomics, 37, pp.386-389, 1996; Panaretto, B.A., Reprod. Fertil. Dev., 5, pp.345-360, 1993; Matsuki, Y., et al, Archs. Oral Biol., 40, pp.161-164, 1995)。

#### 発明の開示

動物の乳中に所望の蛋白質を分泌させる、いわゆる動物工場が最近実用化されている。乳中に所望の蛋白質を分泌させるための動物としては、ウシ、ヒツジ等の哺乳類偶蹄目の動物がよく利用されている。しかしながら、特に所望の蛋白質が比較的大きい場合又は所望の蛋白質の分泌量が多くなった場合は、乳腺が詰まって所望する蛋白質を体外に取り出せなくなる場合が多い。従って、効率のよい動物工場を実用化するためには、動物の乳腺を太くし、乳中に所望の蛋白質が多量に産生されても動物の乳腺が詰まらないようにする手段の開発が必要である。

本発明者はエピモルフィンが S C p 2 細胞の分岐した管構造への分化を誘導することに着目し、偶蹄目エピモルフィン遺伝子を単離すべく鋭意研究を行った。その結果、偶蹄目動物のエピモルフィン遺伝子を単離することに成功し、その遺伝子産物が該動物の乳腺を太くする作用、すなわち管の内径を大きくするように乳腺細胞を分化させる作用を有することを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質 (本明細書において、「ウシエピモルフィン 2」という場合がある。); 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質 (本明細書において「ウシエピモルフィン 4」という場合がある。)、及び、配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質 (本明細書において「ヒツジエピモルフィン 2」という場合がある。) を提供するものである。また、本発明により、配列表の配列番号 1 (ウシエピモルフィン 2) に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列と 95% 以上のホモロジーを有する蛋白質; 配列表の配列番号 1 に記載

のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列を有する蛋白質；及び配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列を有する蛋白質が提供される。

さらに、配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ哺乳類動物由来のミルクプロテインを生産する細胞、好ましくは偶蹄目動物由来のミルクプロテインを生産する細胞において分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質；及び配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ哺乳類動物、好ましくは偶蹄目動物の毛の伸長を促進する蛋白質が提供される。

さらにまた、配列表の配列番号1又は配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなり、かつ配列表の配列番号1又は配列番号5に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列と95%以上のホモロジーを有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質；及び配列表の配列番号1又は配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなり、かつ配列表の配列番号1又は配列番号5に記載のアミノ酸配列の1番目から262番目までのアミノ酸配列と95%以上のホモロジーを有し、かつ毛の伸長を促進する蛋白質が提供される。

別の観点からは、本発明により、上記の各蛋白質をコードするポリヌクレオチドが提供される。この発明の好ましい態様によれば、配列番号2、配列番号4、及び配列番号6に記載のDNAが提供される。また、これらの配列表に記載の塩基配列のうちの連続する12以上の塩基からなるDNAが提供される。このDNAは二本鎖又は一本鎖のいずれでもよく、一本鎖の場合にはセンス鎖又はアンチ

センス鎖のいずれであってもよい。また、上記のDNAにハイブリダイズするRNA；さらに上記ポリヌクレオチドを化学修飾したポリヌクレオチドも本発明により提供される。

さらに、本発明により、上記ポリヌクレオチドを含む組換えベクター、該ベクターを含む微生物細胞又は哺乳類動物細胞などの形質転換細体、及び該形質転換体を培養した培養物から上記蛋白質を分離・精製する工程を含む、上記蛋白質の製造方法が提供される。また、上記の各蛋白質を認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体が本発明により提供される。

#### 発明を実施するための好ましい形態

従来、エピモルフィンには、3つのアイソフォームがあることが知られている(Hirai, Y., et al., J. Cell Biol., 140, pp.159-169, 1998)。これらのアイソフォームは、C末端部分のアミノ酸の数および性質(疎水性又は親水性)によりアイソフォーム1、2、3に分類されている。上記分類に従えば、本発明の蛋白質の好適な例である配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるウシエピモルフィン2、及び配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列からなるヒツジエピモルフィン2は、それぞれ上記のアイソフォーム2に相当するものであると分類される。配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列からなるウシエピモルフィン4は、上記の分類のいずれにも合致せず、従来知られていない新しいタイプのアイソフォームである。

エピモルフィンは、構造上、4つのドメインに分けることができる。本明細書においても本発明のエピモルフィンを構造上4つの部分に分け、それぞれをN末端側から順にドメイン1、ドメイン2、ドメイン3、ドメイン4と呼ぶ。上記のウシエピモルフィン2、ウシエピモルフィン4、及びヒツジエピモルフィン2におけるドメイン1～4は以下のとおりである(配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を単に「アミノ酸配列1」といい、他の配列についても同様である。)

## ウシエピモルフィン 2

ドメイン 1 : アミノ酸配列 1 の 1 番目から 1 0 7 番目

ドメイン 2 : アミノ酸配列 1 の 1 0 8 番目から 1 8 7 番目

ドメイン 3 : アミノ酸配列 1 の 1 8 8 番目から 2 6 2 番目

ドメイン 4 : アミノ酸配列 1 の 2 6 3 番目から 2 8 7 番目

## ウシエピモルフィン 4

ドメイン 1 : アミノ酸配列 3 の 1 番目から 1 0 7 番目

ドメイン 2 : アミノ酸配列 3 の 1 0 8 番目から 1 8 7 番目

ドメイン 3 : アミノ酸配列 3 の 1 8 8 番目から 2 6 2 番目

ドメイン 4 : アミノ酸配列 3 の 2 6 3 番目から 2 6 9 番目

## ヒツジエピモルフィン 2

ドメイン 1 : アミノ酸配列 5 の 1 番目から 1 0 7 番目

ドメイン 2 : アミノ酸配列 5 の 1 0 8 番目から 1 8 7 番目

ドメイン 3 : アミノ酸配列 5 の 1 8 8 番目から 2 6 2 番目

ドメイン 4 : アミノ酸配列 5 の 2 6 3 番目から 2 8 7 番目

ドメイン 1 とドメイン 3 はコイルドコイル領域であり、それぞれ、N側コイルドコイル領域、C側コイルドコイル領域とよばれている。ドメイン 4 は疎水性領域であり、C末端疎水性領域と呼ばれる。ヒトおよびマウスエピモルフィンの知見から、各ドメインは、以下の機能を有することが知られている。

ドメイン 1 : 胎児上顎皮膚での毛の分化促進、胎児肺の管腔構造への分化促進、及び間充細胞の活性化、並びに I L - 6 及び I L - 8 のサイトカイン分泌促進。

ドメイン 2 : 細胞接着と G M - C S F (成長因子、サイトカインの一種) の分泌促進。

ドメイン 3 : 機能未知

ドメイン 4 : タイプ 1 の細胞膜結合ドメイン

ミルクプロテインを生産する細胞の管腔構造の分化促進は、ドメイン 1 またはドメイン 2 の機能である。エピモルフィン及びこれらのドメインの機能は、既報

の方法で確認できる。なお、ウシエピモルフィン2、ウシエピモルフィン4、及びヒツジエピモルフィン2について説明した上記各ドメインに相当するポリペプチド、並びに上記各ドメインのアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、上記各ドメインと実質的に同様な生物作用を有するポリペプチドも本発明の範囲に包含される。

前記の3つのエピモルフィンについて、ウシエピモルフィン2の1番目から262番目までのアミノ酸配列とウシエピモルフィン4の1番目から262番目までのアミノ酸配列は完全に一致しており、このアミノ酸配列とヒツジエピモルフィン2の1番目から262番目までのアミノ酸配列とは、ホモロジーが99.2%と非常によく保存されている。従って、この部分のアミノ酸配列は偶蹄目エピモルフィンを特徴付けるアミノ酸配列であり、このアミノ酸配列からなる蛋白質は本発明の好ましい態様である。また、ウシエピモルフィン2の1番目から262番目までのアミノ酸配列と95%以上、好ましくは98%以上のホモロジーを有し、上記アミノ酸配列と実質的に等価な機能を有する蛋白質は、いずれも本発明の範囲に包含される。なお、ヒツジエピモルフィン2とヒトエピモルフィンとの1番目から262番目までのアミノ酸配列におけるホモロジーは94.3%であり、この場合もよく保存されている。ここで言うホモロジーとは、2つのアミノ酸配列を比較するとき、一方を基準にして他方をアライメントさせた場合に得られる最大値を言う。このようなアライメントは市販のコンピューターソフトウェアを使用することによって簡便に行うことができる。そのようなソフトウェアとしては、例えば、ソフトウェア開発社のジェネティクスーマックが挙げられる。

上記に説明した各蛋白質のほか、配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質、並びに、配列表の配列番号1、3、又は5のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの1または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ毛の伸長を促進する

蛋白質も本発明の範囲に包含される（本明細書において、これらの蛋白質を「改変蛋白質」と呼ぶ場合がある。また、単に「本発明の蛋白質」という場合には、特に言及しない限り、これらの改変蛋白質をも包含する概念として用いる。）。ミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する作用については、J. Cell Biol., 140, pp.159-169, 1998 に記載された方法により確認することが可能である。また、従来公知のエピモルフィン類には毛の伸長を促進する作用があることが知られている（Hirai, Y., et al., Cell, 69, pp.471-481, 1992）。

このような改変蛋白質は、配列番号 1, 3、又は 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする DNA を有する大腸菌などを N-ニトロ-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンなどの薬剤を用いて突然変異処理し、菌体から改変蛋白質をコードする遺伝子を回収した後、通常の遺伝子発現操作を行うことによって製造できる。また、前記遺伝子を亜硫酸ナトリウムなどの薬剤で直接処理するか、あるいは部位特異的変異法（Kramer, W. et al., Methods in Enzymology, 154, 350, 1987）やリコンビナント PCR 法（PCR Technology, Stockton press, 1989）などの手法によってヌクレオチドの欠失、置換、又は付加を直接導入してもよい。

本発明の蛋白質をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されないが、例えば、本明細書の実施例に具体的に説明した方法により効率よく遺伝子 DNA を取得することができる。遺伝暗号の縮重により、ポリヌクレオチドから生産されたポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく、該ポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも一部の塩基を他の種類の塩基に置換することができることは当業者に周知である。従って、本発明のポリヌクレオチドには、配列番号 1, 3、又は 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするエピモルフィン遺伝子はすべて包含される。本発明の好ましい遺伝子の例として、配列表の配列番号 2、配列番号 4、及び配列番号 6 には、それぞれウシエピモルフィン 2、ウシエピモルフィン 4、及びヒツジエピモルフィン 2 をコードする遺伝子 DNA の具体例を示した。

本発明の範囲には、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチドおよびその誘導体が包含される。アンチセンスポリヌクレオチドは上記ポリヌクレオチドの一態様として提供されるが、本明細書において、特にアンチセンス鎖の塩基配列からなるポリヌクレオチドであることを明示する場合に「アンチセンスポリヌクレオチド」という場合がある。該アンチセンスポリヌクレオチドは、上記の各蛋白質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能であり、それがハイブリダイズするポリヌクレオチドがコード領域のポリヌクレオチドであれば、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの生合成を阻害することが可能である。

ポリペプチドの生合成を阻害するためのアンチセンスポリヌクレオチドは、12塩基以上からなることが好ましく、16塩基以上からなるものはさらに好ましい。一方、細胞内に全長のアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませるためには、必要以上に長い配列は好ましくない。細胞内にアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませ、上記蛋白質の生合成を阻害する場合には、12塩基以上30塩基以下、好ましくは15塩基以上25塩基以下、より好ましくは18塩基以上22塩基以下の塩基からなるアンチセンスポリヌクレオチドを用いるのがよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体には、天然に存在するか否かにかかわらず、塩基、リン酸、及び糖からなるヌクレオチドが複数結合したものが全て包含される。代表的なものは、天然型のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAである。非天然型のポリヌクレオチドとしては、例えば、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型などのポリヌクレオチドを挙げることができる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドについて、当業者に利用可能なアンチセンス技術を用いて、目的のDNAやmRNAとの結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性などに優れた様々なアンチセンスポリヌクレオチド誘導体を得られる。

一般的には、ハイブリダイズのし易さの点では、RNAのループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つアンチセンスポリヌクレオチドまた



はその誘導体を設計することが好ましい。また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、又はスプライス部位の配列に相補的な配列を有するようなアンチセンスポリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる。したがって、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体であって、上記の各蛋白質をコードする遺伝子またはmRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、及び／又はスプライス部位の相補的な配列を含むものは、発現抑制効果の観点から好ましい態様である。

現在、一般的に知られているポリヌクレオチド誘導体のうち、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも一が高められた誘導体として、好ましくはフォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体を挙げるることができる。本発明のポリヌクレオチドおよびその誘導体には、これらの機能または構造を有する誘導体が含まれる。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドのうち、天然型のアンチセンスポリヌクレオチドについては、化学合成機を使用して合成するか、上記の各蛋白質をコードするDNAを鋳型とするPCR法により製造することができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型などのポリヌクレオチド誘導体は、通常、化学合成により製造することができる。この場合には、化学合成機に添付されている説明書に従って操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することが可能である。

本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド、そのアンチセンスポリヌクレオチドまたはそれらの一部（連続する12塩基以上の塩基配列からなるポリヌクレオチド）であるポリヌクレオチドは、cDNAライブラリー等から本発明の遺伝子をスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。このような目的には、GC含有率が30ないし70%のものが好適に使用可能である。また、連続する16塩基以上の塩基配列からなるポリヌクレオチドが特に好ましい。プローブとして用いる該ポリヌクレオチドは誘導体であってもよい。通常、前記の塩基数以上の配列は特異性のある配列であると認識されている。

該プローブを用いたスクリーニングにおいて使用するcDNAライブラリーとしては、mRNAから作製されたものが好ましく使用できる。これらのcDNAライブラリーからランダムサンプリングにより選択された一群のcDNAを検索の試料とすることができる。また、市販のものも使用可能である。例えば、配列表の配列番号2、4、又は6に記載の塩基配列のうちの連続する12塩基以上の塩基配列からなるDNAまたは該DNAにハイブリダイズするポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチド）は、それぞれ配列番号1、3、又は5に記載のアミノ酸配列をコードするDNAをcDNAライブラリー等からスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。

また、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチド若しくはそのアンチセンスポリヌクレオチド、またはそれらの一部であるポリヌクレオチドをプローブとして、各組織由来のmRNAについてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うことにより、本発明の遺伝子由来のmRNAが発現している組織を見出すことが可能である。

本発明の遺伝子とハイブリダイズするcDNAを適当なベクターに挿入した後、宿主（例えば大腸菌）に導入することで形質転換体を作製することができる。ベクターの種類及び宿主の種類は特に限定されないが、宿主の種類に応じて適宜の発現用ベクターを選択して用いることが可能である。宿主としては、大腸菌等の細菌類、酵母、又は動物細胞のいずれも使用可能であるが、動物細胞を用いることが好ましく、哺乳類動物細胞を用いることが特に好ましい。組換えベクターを大腸菌等の適当な宿主に導入して形質転換体を得る方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。

本発明の遺伝子を導入した形質転換体を培養して遺伝子DNAの増幅または蛋白質の発現を行わせ、本発明の蛋白質を製造することが可能である。形質転換体の製造及び培養については各種の成書及び報告があり、種々の手段が開発され、当業界で汎用されている。従って、当業者は本明細書に記載された塩基配列に基づいて本発明の蛋白質を容易に製造することが可能である。細胞に遺伝子を導入

する手法として、塩化カルシウム法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法などを用いることができる。特に、核内微量注入法を用いることが好ましい。

培養物から目的蛋白質の分離及び精製は当業者に利用可能な手段を適宜組み合わせで行うことができる。例えば、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行うことにより、本発明の蛋白質を効率よく回収及び精製することが可能である。より具体的には、免疫沈降法、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法や抗体クロマトグラフィー法等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー法、及び逆相クロマトグラフィー法などを適宜選択して行えばよい。

また、本発明の蛋白質は、他のポリペプチドとの融合ペプチドとして製造することも可能である。このような融合ペプチドも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。融合すべきポリペプチドの種類は特に限定されないが、例えば、細胞外分泌を促進するシグナルペプチドなどを挙げることができる。このような融合蛋白質の製造も形質転換体を用いて行うことができる。融合蛋白質を用いて本発明の蛋白質又は改変蛋白質を製造する場合には、融合蛋白質をブロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理し、切り出された目的物を分離及び精製すればよい。

また、本発明の蛋白質又は改変蛋白質においてエピモルフィン様の生物活性を担う部分ポリペプチド（いわゆる活性ドメイン）と他のポリペプチドとの融合蛋白質を製造することも可能である。このような活性ドメインとしては、例えば、上記のドメイン1及び／又はドメイン2を用いることができる。例えば、ドメイン4を除去することにより活性ドメインを含む可溶性ポリペプチドを製造することができ、このように可溶化された活性ドメインと他のポリペプチド（例えばシグナルペプチド）との融合蛋白質を製造することができる。なお、本発明の蛋白質の上記各ドメイン及び他の種のエピモルフィンの各ドメインから選ばれる複数

のドメインを適宜組み合わせてキメラ型のエピモルフィンを製造してもよい。また上記の各ドメインを適宜組み合わせたポリペプチドに対して、さらに他のポリペプチドを結合して融合蛋白質を製造してもよい。

本発明の蛋白質又はそれらの部分ポリペプチド鎖を用いて、本発明の蛋白質を認識する抗体を製造することができる。本発明の抗体は、哺乳類動物を本発明の蛋白質で免疫感作することによって当業界で汎用の方法に従って製造できる。該抗体が本発明の蛋白質を認識することは、ウェスタンブロット法、ELISA法、又は免疫染色法(例えばFACSでの測定)等により確認することが可能である。免疫原としては、本発明の蛋白質のほか、それらの一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いてもよい。この場合、本発明の蛋白質の一部は8アミノ酸残基以上であることが好ましく、このようなポリペプチドは、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。

また、免疫した動物のリンパ球を用いて製造したハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を本発明の抗体として用いてもよい。モノクローナル抗体の製造方法については当業界で周知されており、かつ汎用されている(『Antibodies A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988) Chapter 6)。また、本発明の抗体として、上記の抗体の活性フラグメントを用いることも可能である。本明細書において、活性フラグメントとは抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味しており、具体的には、 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$ などを挙げることができる。例えば、本発明の抗体をペプシンで分解すると $F(ab')_2$  が得られ、パパインで分解すると $Fab$  が得られる。 $F(ab')_2$  を2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化すると $Fab'$  が得られる。 $Fv$ は重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカーで結合させた一価の抗体活性フラグメントである。これらの活性フラグメントを保持し、その他の部分を他の動物のフラグメントに置換することでキメラ抗体が得られる。上記に説明した抗体及び活性フラグメントな

どは、いずれも本発明の範囲に包含される。

本発明の蛋白質は、抗体を用いる方法又は酵素反応を利用する方法などに従って検出可能である。抗体を用いて本発明の蛋白質を検出する方法としては、具体的には、(I)標識された上記抗体を用いて本発明の蛋白質を検出する方法、(II)上記抗体および該抗体の標識二次抗体を用いて本発明の蛋白質を検出する方法が挙げられる。標識としては、例えば放射性同位元素 (R I)、酵素、アビジンもしくはビオチン、または蛍光物質 (F I T Cやローダミン等) が利用される。酵素反応を利用する方法としては、例えば、E L I S A法、免疫凝集法、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリーを用いた免疫反応分子の同定方法又はそれらに類似する方法が挙げられる。

#### 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

本発明のヒッジ及びウシエピモルフィン遺伝子を、以下に記載の方法により、取得した。

##### (1) エピモルフィン cDNA の単離

1) プロブとするDNAをRandom Primed DNA labeling Kit (ベーリンガー社製) を用いて取扱説明書の通りに標識した。プロブとするDNAは、マウスエピモルフィンのコード領域の全長の塩基配列からなるDNAを使用した。

2) 次に、下記の組成のDNA反応液を調製し、この液を37°Cで30分間インキュベートした後、65°Cで10分間熱処理し、酵素を失活させた。

DNAプロブ (50 ng/μl)	2 μl
H <sub>2</sub> O	7 μl
dNTPs	3 μl
[α- <sup>32</sup> P] d-CTP (370 MBq/ml) (アマシャム社製)	5 μl

Primer	2 $\mu$ l
Klenow enzyme	1 $\mu$ l
	合計 20 $\mu$ l

3) H<sub>2</sub>Oで膨潤させたCentri-Sepスピンカラム (プリンストンセパレーション社製) で遠心して、標識化DNAプローブを得た。

4) ライブラリーはヒツジ肺及びウシ肺を使い (Uni-ZAPXR Library, STRATAGENE社製)、常法によりファージブランクを得た。

5) 3) で得られた標識化DNAプローブをシンチレーションカウンターで測定し、 $1 \times 10^6$  cpm/mlになるようにハイブリダイゼーション反応液に加え、ブランク由来のcDNAを固定したナイロンメンブレン (アマシャム社製、Hybond-N+) と反応させた。

プレハイブリダイゼーション

反応液 ExpressHyb (クローンテック社製)

反応温度 68°C

反応時間 30 分間

ハイブリダイゼーション

反応液 ExpressHyb (クローンテック社製)

<sup>32</sup>P 標識 cDNA プローブ  $1 \times 10^6$  cpm/ml

反応温度 68°C

反応時間 1 時間

6) ハイブリダイズの終了したメンブレンを以下の液でExpressHyb (クローンテック社製) のプロトコール通りに洗浄した。

2×SSC、0.05% SDS 500 ml

室温

時間 40 分間

0.1×SSC、0.1% SDS

50°C

時間 40 分間

7) 洗浄したナイロンメンブレンをX線フィルム（例えば、コダック社製XAR 5フィルム）に $-80^{\circ}\text{C}$ で一晩露光し、オートラジオグラフを撮影した。

8) 得られたオートラジオグラフから、陽性のブランクの位置を決定し、対応する寒天上のブランク中のファージをSM溶液に回収した。

9) 回収したファージは、常法により再度NZY寒天培地上にブランク形成を行わせ、ナイロンメンブレン上に固定した。

10) 5) ~ 9) の過程を3回繰り返し、陽性のブランク中のファージを単一なものにした。該ファージを回収し、 $500\mu\text{l}$ のSM溶液に懸濁し、 $20\mu\text{l}$ のクロロホルムを加えて攪拌し、ファージ液を作製した。該ファージ液から単離したcDNAにヒッジ及びウシエピモルフィン遺伝子が含まれていた。

## (2) ヒッジ及びウシエピモルフィンcDNAの大量調製

1) SM溶液に懸濁したファージ液 $10\mu\text{l}$ とXL1-Blue大腸菌（ストラタジーン社製） $200\mu\text{l}$ とヘルパーファージ（ストラタジーン社製） $1\mu\text{l}$ を混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、15分間反応させた。

2) その後、 $3\text{ml}$  LB培地に1) で混合した溶液を移し、 $37^{\circ}\text{C}$ で1晩振とうすることにより遺伝子をpBluescript phagemidとして切り出した。

3)  $70^{\circ}\text{C}$ で20分間処理した後、 $1000\text{rpm}$ 、15分間遠心分離し、上清を回収した。

4) 上清 $100\mu\text{l}$ とSOLR大腸菌 $200\mu\text{l}$ を混合し $37^{\circ}\text{C}$ で15分間反応させた。

5) その後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB培地のプレートに4) で反応した溶液 $10\mu\text{l}$ をまき、 $37^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。

6) 1コロニーを $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB培地 $3\text{ml}$ に加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で1晩振とう培養した。

7) 2000 rpm、10分間遠心分離し大腸菌を回収した。

8) Plasmid Mini Kit (QIAGEN社製) を使って精製し、ヒツジ又はウシエピモルフィン遺伝子を含んだプラスミドDNAを大量に調製した。

### (3) ヒツジ及びウシエピモルフィン cDNA の塩基配列の決定

オートシーケンサーを用いたダイターミネーター法によりプラスミドDNA中のヒツジ及びウシエピモルフィン遺伝子の全塩基配列を決定した。

### (4) アミノ酸配列の決定

上記3. で決定した塩基配列から、ヒツジ及びウシエピモルフィンのアミノ酸配列を決定した (このためのコンピューターソフトウェアはジェネティクスーマック (ソフトウェア開発社製) を使用した)。

それぞれのアミノ酸配列から、ヒツジエピモルフィン2、ウシエピモルフィン2、ウシエピモルフィン4とそれぞれ名付けた。

### (5) 形質転換体の作製

ヒツジエピモルフィン2、ウシエピモルフィン2およびウシエピモルフィン4それぞれのcDNAをpBluescript SK (-) プラスミドに挿入し、大腸菌SOLR株に導入して形質転換体を作製した。これらを、それぞれSh-EPM2、Bo-EPM2、Bo-EPM4と名付けた。

### 産業上の利用の可能性

本発明の蛋白質は、エピモルフィン様の生物活性、例えば、ミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する作用、及び毛の伸長を促進する作用を発揮できる。本発明の蛋白質は、偶蹄目動物に対する医薬又は動物改質剤として用いることが可能である。例えば、ウシやヒツジなどの偶蹄目動物



の乳腺を太くし、乳腺の詰まりを防いで該動物の乳中に分泌される所望の蛋白質の収量を増やすことができる。また、本発明の遺伝子を用いて、羊毛の生産性の高いヒツジや、目的蛋白質の生産性の高い遺伝子導入動物（動物工場）を産生することが可能である。

## 請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 にいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質。
2. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列と 95% 以上のホモロジーを有する蛋白質。
3. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 2 項に記載の蛋白質。
4. 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 2 項に記載の蛋白質。
5. 配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質。
6. 配列表の配列番号 1 又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなり、かつ配列表の配列番号 1 又は配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列と 95% 以上のホモロジーを有し、かつミルクプロテインを生産する細胞の分岐した管腔構造への分化を誘導する蛋白質。
7. 配列表の配列番号 1、配列番号 3、又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなるアミノ酸配列を有し、かつ毛の伸長を促進する蛋白質。
8. 配列表の配列番号 1 又は配列番号 5 のいずれかに記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列のうちの 1 または数個のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は付加させてなり、かつ配列表の配列番号 1 又は配列番号 5 に記載のアミノ酸配列の 1 番目から 262 番目までのアミノ酸配列と 95% 以上のホ

モロジーを有し、かつ毛の伸長を促進する蛋白質。

9. 請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項に記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

10. 配列番号2、配列番号4、又は配列番号6のいずれかに記載のDNAである請求の範囲第9項に記載のポリヌクレオチド。

11. 請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項に記載の蛋白質を認識する抗体。

## Sequence Listing

&lt;110&gt; Sumitomo Electric Industries, Co., Ltd.

&lt;120&gt; Artiodactyla epimorphin

&lt;130&gt; 99044M

&lt;160&gt; 6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 287

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bos

&lt;400&gt; 1

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp

5

10

15

Gly Asp Thr Thr Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe

20

25

30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Ala Lys Ile Ala Gln

35

40

45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro

50

55

60

Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu

65

70

75

80

Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Thr Lys Leu Lys Ser Ile Glu

85

90

95

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Gly Gly Asn Arg Thr Ser Val Glu Leu

100

105

110

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu

115

120

125

Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser

130

135

140

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Lys Thr Thr Thr

145

150

155

160

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ile Phe

165

170

175

Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn

180

185

190

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile

195

200

205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr

210

215

220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Lys Asn Val Met Asn Ala Ala

225

230

235

240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr

245

250

255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Met Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Val

260

265

270

Ile Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser

275

280

285

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 864

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bos

&lt;400&gt; 2

ATG CGG GAC CGG CTG CCG GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAA AAT GAT GAT

48

GGG GAC ACA ACT GTT GTT GTT GAA AAG GAC CAT TTT ATG GAT GAT TTC

96

TTC CAT CAG GTC GAG GAG ATC AGA AAC AGT ATA GCG AAA ATA GCT CAG 144  
 TAT GTC GAA GAA GTG AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 192  
 AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAG GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 240  
 ATC AAG AAA ACT GCT AAT AAA ATA AGG ACT AAG TTG AAG TCT ATT GAA 288  
 CAG AGT TTT GAT CAG GAT GAG GGT GGA AAC CGA ACT TCT GTG GAG CTT 336  
 CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCA GTG CTA TCT CGA AAG TTT GTG GAA 384  
 GTC ATG ACA GAA TAT AAC GAA GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGA AGC 432  
 AAA GGC CGT ATA CAG CGT CAG CTA GAA ATA ACT GGA AAA ACT ACC ACC 480  
 GAT GAT GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAA AGT GGG AAT CCC TCC ATC TTC 528  
 ACG TCA GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAG GCT CTC AAT 576  
 GAA ATT GAG TCC CGT CAT AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACA AGC ATC 624  
 CGT GAG CTA CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCC ATG TTC GTC GAG ACT 672  
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AAA AAT GTT ATG AAT GCC GCA 720  
 GAC TAT GTA GAA CAT GCA AAA GAA GAA ACG AAG AAA GCT ATT AAA TAT 768  
 CAA AGC AAA GCA AGA AGG AAA ATG ATG TTC ATT ATT ATT TGT GTA GTT 816  
 ATT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG 864

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 269

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bos

&lt;400&gt; 3

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp

5

10

15

Gly Asp Thr Thr Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe

20

25

30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Ala Lys Ile Ala Gln

35

40

45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro  
 50 55 60  
 Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Thr Lys Leu Lys Ser Ile Glu  
 85 90 95  
 Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Gly Gly Asn Arg Thr Ser Val Glu Leu  
 100 105 110  
 Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu  
 115 120 125  
 Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
 130 135 140  
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Lys Thr Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ile Phe  
 165 170 175  
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
 180 185 190  
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile  
 195 200 205  
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
 210 215 220  
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Lys Asn Val Met Asn Ala Ala  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
 245 250 255  
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Val Ser Leu Val Phe Gln Ser

260

265

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 810

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bos

&lt;400&gt; 4

ATG CGG GAC CGG CTG CCG GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAA AAT GAT GAT	48
GGG GAC ACA ACT GTT GTT GTT GAA AAG GAC CAT TTT ATG GAT GAT TTC	96
TTC CAT CAG GTC GAG GAG ATC AGA AAC AGT ATA GCG AAA ATA GCT CAG	144
TAT GTC GAA GAA GTG AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA	192
AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAG GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA	240
ATC AAG AAA ACT GCT AAT AAA ATA AGG ACT AAG TTG AAG TCT ATT GAA	288
CAG AGT TTT GAT CAG GAT GAG GGT GGA AAC CGA ACT TCT GTG GAG CTT	336
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCA GTG CTA TCT CGA AAG TTT GTG GAA	384
GTC ATG ACA GAA TAT AAC GAA GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGA AGC	432
AAA GGC CGT ATA CAG CGT CAG CTA GAA ATA ACT GGA AAA ACT ACC ACC	480
GAT GAT GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAA AGT GGG AAT CCC TCC ATC TTC	528
ACG TCA GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAG GCT CTC AAT	576
GAA ATT GAG TCC CGT CAT AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACA AGC ATC	624
CGT GAG CTA CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCC ATG TTC GTC GAG ACT	672
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AAA AAT GTT ATG AAT GCC GCA	720
GAC TAT GTA GAA CAT GCA AAA GAA GAA ACG AAG AAA GCT ATT AAA TAT	768
CAA AGC AAA GCA AGA AGG GTG AGT TTG GTC TTT CAG AGT TGA	810

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 287

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Ovis



&lt;400&gt; 5

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp

1 5 10 15

Gly Asp Thr Thr Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe

20 25 30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Ala Lys Ile Ala Gln

35 40 45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro

50 55 60

Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu

65 70 75 80

Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Thr Lys Leu Lys Ser Ile Glu

85 90 95

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Gly Gly Asn Arg Thr Ser Val Glu Leu

100 105 110

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu

115 120 125

Val Met Thr Glu Phe Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser

130 135 140

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Lys Thr Thr Thr

145 150 155 160

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ile Phe

165 170 175

Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn

180 185 190

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile

195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr

210

215

220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Lys Asn Val Thr Asn Ala Ala

225

230

235

240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr

245

250

255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Met Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Val

260

265

270

Ile Leu Leu Val Ile Phe Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser

275

280

285

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 864

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Ovis

&lt;400&gt; 6

ATG CGG GAC CGG CTG CCG GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAA AAT GAT GAT	48
GGG GAC ACA ACT GTT GTT GTT GAA AAG GAC CAT TTT ATG GAT GAT TTC	96
TTC CAT CAG GTC GAG GAG ATC AGA AAC AGT ATA GCA AAA ATA GCT CAG	144
TAT GTC GAA GAA GTG AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA	192
AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAG GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA	240
ATC AAG AAA ACT GCC AAT AAA ATT CGG ACT AAG TTG AAG TCT ATT GAA	288
CAG AGT TTT GAT CAG GAT GAG GGT GGA AAC CGA ACT TCT GTG GAG CTT	336
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCA GTG CTA TCT CGA AAG TTT GTG GAA	384
GTC ATG ACA GAA TTT AAT GAA GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGA AGC	432
AAA GGC CGT ATA CAG CGT CAG CTA GAA ATA ACT GGA AAA ACT ACC ACC	480
GAT GAT GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAA AGT GGG AAT CCC TCC ATC TTC	528
ACG TCA GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGA CAG GCT CTG AAT	576

GAA ATT GAG TCC CGT CAT AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACG AGC ATC	624
CGT GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCC ATG TTC GTC GAG ACC	672
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AAA AAT GTT ACG AAT GCC GCA	720
GAC TAT GTT GAG CAT GCT AAA GAA GAA ACG AAG AAA GCC ATT AAA TAT	768
CAA AGC AAA GCA AGA AGG AAA ATG ATG TTC ATT ATT ATC TGT GTA GTT	816
ATT TTG CTT GTG ATC TTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG	864

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/00, C07K14/47, 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/00, C07K14/47, 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN), GeneBank, EMBL, DDBJ, PIR, SwissProt, Genseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 6-25295, A, (Biomedical Research Institute Co., Ltd.), 01 February, 1994 (01.02.94), Claims and examples,	1-4, 9-11
Y	& WO, 93/8213, A1 & EP, 562123, A1 & US, 5726298, A & DE, 69229219, A1	5-8
Y	JP, 9-65885, A, (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 11 March, 1997 (11.03.97), Claims and examples (Family: none)	5-8
Y	JP, 8-325293, A, (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 10 December, 1996 (10.12.96), Claims and examples, & EP, 698666, A2 & CA, 2152210, A	5-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 November, 1999 (11.11.99)

Date of mailing of the international search report  
24 November, 1999 (24.11.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04479

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C12N15/00, C07K14/47, 16/18

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C12N15/00, C07K14/47, 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN), GeneBank, EMBL, DDBJ, PIR, SwissProt, Genseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 6-25295, A, (株式会社バイオマテリアル研究所), 1. 2月. 1994 (01. 02. 94), 特許請求の範囲及び実施例参照, & WO, 93/8213, A1 & EP, 562123, A1 & US, 5726298, A & DE, 69229219, A1	1-4, 9-11 5-8
Y	JP, 9-65885, A, (住友電気工業株式会社), 11. 3月. 1997 (11. 03. 97), 特許請求の範囲及び実施例参照, (ファミリーなし)	5-8
Y	JP, 8-325293, A, (住友電気工業株式会社), 10. 12月. 1996 (10. 12. 96), 特許請求の範囲及び実施例参照, & EP, 698666, A2 & CA, 2152210, A	5-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 11. 99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488